

#7

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Brigitte BATHE, et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HEREWITH

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCE WHICH CODE FOR THE meth GENE

REQUEST FOR PRIORITY

1017 U.S. PTO
09/919891
08/02/01

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☒ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number 60/294,251, filed May 31, 2001, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	100 38 050.6	August 2, 2000
GERMANY	101 09 687.9	February 28, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

36379



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

Robert W. Hahl
Registration No. 33,893

Docket No. 211714US0X

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

INVENTOR(S) Brigitte BATHE, et al.

SERIAL NO: New Application

FILING DATE: Herewith

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE meth GENE

J1017 U.S. PTO
09/919891
08/02/01

FEE TRANSMITTAL

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

FOR	NUMBER FILED	NUMBER EXTRA	RATE	CALCULATIONS
TOTAL CLAIMS	34 - 20 =	14	× \$18 =	\$252.00
INDEPENDENT CLAIMS	5 - 3 =	2	× \$80 =	\$160.00
<input type="checkbox"/> MULTIPLE DEPENDENT CLAIMS (If applicable)			+ \$270 =	\$0.00
<input checked="" type="checkbox"/> LATE FILING OF DECLARATION			+ \$130 =	\$130.00
BASIC FEE				\$710.00
TOTAL OF ABOVE CALCULATIONS				\$1,252.00
<input type="checkbox"/> REDUCTION BY 50% FOR FILING BY SMALL ENTITY				\$0.00
<input type="checkbox"/> FILING IN NON-ENGLISH LANGUAGE			+ \$130 =	\$0.00
<input type="checkbox"/> RECORDATION OF ASSIGNMENT			+ \$40 =	\$0.00
TOTAL				\$1,252.00

- ☐ Please charge Deposit Account No. 15-0030 in the amount of _____ A duplicate copy of this sheet is enclosed.
- ☒ A check in the amount of **\$1,252.00** to cover the filing fee is enclosed.
- ☒ The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required for the papers being filed herewith and for which no check is enclosed herewith, or credit any overpayment to Deposit Account No. 15-0030. A duplicate copy of this sheet is enclosed.

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

Robert W. Hahl
Registration No. 33,893

Date: 8/2/01



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/00)



J1017 U.S. PTO
09/919891



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 09 687.9

Anmeldetag: 28. Februar 2001

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Neue für das methH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Priorität: 02.08.2000 DE 100 38 050.6

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 28. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

Neue für das methH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das methH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen das methH-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. die Methionin-Analoga α -Methyl-Methionin, Ethionin, Norleucin, N-acetylnorleucin, S-Trifluoromethylhomocystein, 2-amino-5-heprenoitsäure, Seleno-Methionin, Methioninsulfoximin, Methoxin, 1-Aminocyclopentan-Carboxylsäure oder auxotroph

für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren wie z.B. L-Methionin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-
5 Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

10 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt,
15 sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das methH-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der
20 Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine
25 Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der
5 Homocystein-Methyltransferase II aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte
Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 10 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid enthaltend die Nukleo-
20 tidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2
dargestellt, enthält

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,
25 insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den
Vektor enthalten oder in denen das methH-Gen verstärkt
ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit
5 der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung
10 enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für Homocystein-Methyltransferase II kodieren, oder um solche Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe
15 Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Homocystein-Methyltransferase II-Gens aufweisen.

Polynukleotid, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen
20 hergestellt werden kann, die für Homocystein-Methyltransferase II kodieren.

Solche, als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende
25 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

30 „Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
5 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Homocystein-Methyltransferase II und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu
10 wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-
15 Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren, und in denen die für das methH-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang
20 die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein
25 entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose,
30 Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art

Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- 5 Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
10 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- 15 oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise der L-Methionin produzierende Stamm

Corynebacterium glutamicum ATCC21608.

- 20 Das neue, für das Enzym Homocystein-Methyltransferase II (EC 2.1.1.13) kodierende methH-Gen von C. glutamicum wurde isoliert.

- Zur Isolierung des methH-Gens oder auch anderer Gene von C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt. Das
25 Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:
30 Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.

Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das Gen *methH* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins

abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des methH-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH

(Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- 5 findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

- Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach
10 Überexpression des methH-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, produzieren.

- Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die
15 Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im
20 Verlaufe der fermentativen L-Methionin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die
25 Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht
30 werden.

- Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns
35 et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen

Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße methH-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise

pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin vorteilhaft sein, neben dem methH-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.

So kann für die Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 5 • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (ACCESSION Number P26512),
- 10 • das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (ACCESSION Number AF052652),
- das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),
- das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931)
- 15 • das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (JP-A-08107788),
- das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende Gen metY (DSM 13556)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

20 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des methH Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB (ACCESSION Number P08210),
- 25 • das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (ACCESSION Number Q04513),

- das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (ACCESSION Number P23669),
- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (ACCESSION Number Y00151),
- 5 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),
- 10 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des methH-Gens unerwünschte Nebenreaktionen aususchalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing
15 Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können
20 kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über
25 bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

30 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen

von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- 5 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure,
10 Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,
15 Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 20 Als Schwefelquelle, insbesondere für die Herstellung von Methionin können organische und anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfide, Sulfite, Sulfate und Thiosulfate verwendet werden.

- Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die
25 entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe
30 wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines

einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

- 5 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem
- 10 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur
- 15 eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

- 20 Die so erhaltenen, insbesondere L-Methionin enthaltenden Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-% und enthalten L-Methionin. Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation
- 25 zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf ≥ 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

- Die in dieser Weise hergestellte, insbesondere L-Methionin
- 30 haltige, Fermentationsbrühe wird anschließend weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden wie z.B. der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus aus der Fermentationsbrühe entfernt
- 35 oder vollständig in ihr belassen werden. Anschließend wird

diese mit bekannten Methoden wie z.B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert.

- 5 Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet werden.
- 10 Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Vorteilhaft bei der Granulation oder Kompaktierung ist der Einsatz von üblichen
- 15 organischen oder anorganischen Hilfsstoffen, beziehungsweise Trägern wie Stärke, Gelatine, Cellulosederivaten oder ähnlichen Stoffen, wie sie üblicherweise in der Lebensmittel- oder Futtermittelverarbeitung als Binde-, Gelier-, oder Verdickungsmittel Verwendung
- 20 finden, oder von weiteren Stoffen wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikaten oder Stearaten.

Unter „rieselfähig“ versteht man Pulver, die aus einer Serie von Glasauslaufgefäßen mit verschiedenen großen Auslauföffnungen mindestens aus dem Gefäß mit der Öffnung 5 mm (Millimeter) ungehindert auslaufen (Klein, Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).

- Wie hier beschrieben, ist mit „feinteilig“, ein Pulver mit überwiegendem Anteil (> 50 %) einer Korngröße von 20 bis 200 µm Durchmesser gemeint. Mit „grobkörnig“ sind Produkte
- 30 mit überwiegendem Anteil (> 50 %) einer Korngröße von 200 bis 2000 µm Durchmesser gemeint. In diesem Sinne, bedeutet „staubfrei“, daß das Produkt lediglich geringe Anteile (< 5 %) an Korngrößen unter 20 µm Durchmesser enthält. Die Korngrößenbestimmung kann mit Methoden der
- 35 Laserbeugungsspektrometrie durchgeführt werden. Die

entsprechenden Methoden sind im Lehrbuch zur „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis“ von R. H. Müller und R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) oder im Lehrbuch „Introduction to Particle Technology“ von M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998) beschrieben.

„Lagerbar“, im Sinne dieser Erfindung, bedeutet ein Produkt, das bis zu 120 Tagen, bevorzugt bis 52 Wochen, besonders bevorzugt 60 Monate gelagert werden kann ohne das ein wesentlicher Verlust (< 5%) an Methionin auftritt.

Alternativ kann das Produkt aber auch auf einen in der Futtermittelverarbeitung bekannten und üblichen organischen oder anorganischen Trägerstoff wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien, Mehle, Stärken Zucker oder andere aufgezogen und/oder mit üblichen Verdickungs- oder Bindemitteln vermischt und stabilisiert werden. Anwendungsbeispiele und Verfahren hierzu sind in der Literatur (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, Seite 817) beschrieben.

Schließlich kann das Produkt durch Beschichtungsverfahren („Coating“) mit Filmbildnern wie beispielsweise Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginat, Stearate, Stärken, Gummi und Celluloseether, wie in der DE-C-4100920 beschrieben, in einen Zustand gebracht werden, in dem es stabil gegenüber der Verdauung durch Tiermägen insbesondere dem Magen von Wiederkäuern ist.

Wird die Biomasse während des Verfahrens abgetrennt, werden im allgemeinen weitere, zum Beispiel während der Fermentation zugesetzte anorganische Feststoffe entfernt. Daneben enthält das erfindungsgemäße Tierfuttermitteladditiv zumindest den überwiegenden Teil der in der Fermentationsbrühe gelöst vorliegenden, weiteren gebildeten oder zugesetzten, insbesondere organische

Stoffe, soweit sie nicht durch geeignete Verfahren abgetrennt wurden.

In einem Aspekt der Erfindung kann die Biomasse bis zu 70%, bevorzugt bis zu 80%, bevorzugt bis zu 90%, bevorzugt bis zu 95%, und besonders bevorzugt bis zu 100% abgetrennt werden. In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden bis zu 20% der Biomasse, bevorzugt bis zu 15%, bevorzugt bis zu 10%, bevorzugt bis zu 5%, besonders bevorzugt keine Biomasse abgetrennt.

10 Zu diesen organischen Stoffen gehören organische Nebenprodukte, die von den bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen gegebenenfalls neben dem L-Methionin erzeugt und gegebenenfalls ausgeschieden werden. Dazu zählen L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-
15 Lysin, L-Valin, L-Threonin, L-Alanin oder L-Tryptophan. Dazu zählen Vitamine ausgewählt aus der Gruppe Vitamin B1 (Thiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin B5 (Pantothersäure), Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B12 (Cyanocobalamin), Nicotinsäure/Nicotinsäureamid und Vitamin
20 E (Tocopherol). Dazu gehören weiterhin organische Säuren, die ein bis drei Carboxyl-Gruppen tragen wie zum Beispiel Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure oder Fumarsäure. Schließlich gehören dazu auch Zucker wie zum Beispiel Trehalose. Diese Verbindungen sind gegebenenfalls
25 erwünscht, wenn sie die nutritive Wertigkeit des Produktes verbessern.

Diese organischen Stoffe einschließlich des L-Methionins und/oder D-Methionins und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin können auch je nach Anforderung während eines
30 geeigneten Verfahrensschrittes als Konzentrat oder Reinsubstanz in fester oder flüssiger Form hinzugefügt werden. Diese genannten organischen Stoffe können einzeln oder als Mischungen zur erhaltenen oder aufkonzentrierten Fermentationsbrühe, oder auch während des Trocknungs- oder
35 Granulationsprozesses hinzugefügt werden. Es ist

gleichfalls möglich einen organischen Stoff oder eine Mischung mehrerer organischen Stoffe zur Fermentationsbrühe und einen weiteren organischen Stoff oder eine weitere Mischung mehrerer organische Stoffe bei einem späteren
5 Verfahrensschritt, beispielsweise der Granulation, hinzuzufügen.

Das oben beschriebene Produkt ist als Futtermittelzusatz, d.h. Futtermittel-Additiv, für die Tierernährung geeignet.

Der L-Methionin-Gehalt des Tierfuttermittel-Additivs
10 beträgt üblicherweise 1 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bevorzugt 2 Gew.-% bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 4 Gew.-% bis 80 Gew.-%, und ganz besonders bevorzugt 8 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse des Tierfuttermittel-Additivs. Gehalte von 1 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 60 Gew.-%,
15 4 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 6 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 1 Gew.-% bis 40 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 40 Gew.-% oder 4 Gew.-% bis 40 Gew.-% sind gleichfalls möglich. Der Wassergehalt des Futtermittel-Additivs beträgt üblicherweise bis zu 5 Gew.-%, bevorzugt bis zu 4 Gew.-%, und besonders bevorzugt
20 weniger als 2 Gew.-%.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte

- 25 a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- 30 c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und

- d) Trocknung der gemäß a) und/oder b) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

5 Wenn erwünscht, können in dem erfindungsgemäßen Verfahren weiterhin eine oder mehrere der folgenden Schritte durchgeführt werden:

- 10 e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu dem gemäß a), b) und/oder c) erhaltenen Produkten;
- f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach a) bis d) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
- 15 g) Überführung der nach a) bis e) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

20 Die Analyse von L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin.

25 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

30 Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)

beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert.

Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin

ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des methH-Gens

5 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im
10
15 Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung
20 Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et
25 al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm
30 DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.

10 Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, 15 Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem

20 zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein

25 offenes Leseraster von 3662 Basenpaaren, welches als methH-Gen bezeichnet wurde. Das methH-Gen kodiert für ein Protein von 1221 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das methH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000365 BT

<140>

10 <141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4301

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (385)..(4047)

25 <223> methH-Gen

<400> 1

taagggtttt ggaggcattg gccgcgaacc catcgctggt catcccgggt ttgcgcatgc 60

30 cacgttcgta ttcataacca atcgcgatgc cttgagccca ccagccactg acatcaaagt 120

tgtccacgat gtgcttttgcg atgtgggtgt gagtccaaga ggtggctttt acgtcgtcaa 180

gcaatttttag ccactcttcc cacggctttc cggtgccgtt gaggatagct tcaggggaca 240

35 tgccctggtgt tgagccttgc ggagtggagt cagtcatgcg accgagacta gtggcgcttt 300

gcctgtgttg cttaggcggc gttgaaaatg aactacgaat gaaaagtctg ggaattgtct 360

40 aatccgtact aagctgtcta caca atg tct act tca gtt act tca cca gcc 411

Met Ser Thr Ser Val Thr Ser Pro Ala

1

5

45 cac aac aac gca cat tcc tcc gaa ttt ttg gat gcg ttg gca aac cat 459

His Asn Asn Ala His Ser Ser Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His

10

15

20

25

gtg ttg atc ggc gac ggc gcc atg ggc acc cag ctc caa ggc ttt gac 507

Val Leu Ile Gly Asp Gly Ala Met Gly Thr Gln Leu Gln Gly Phe Asp

30

35

40

50 ctg gac gtg gaa aag gat ttc ctt gat ctg gag ggg tgt aat gag att 555

Leu Asp Val Glu Lys Asp Phe Leu Asp Leu Glu Gly Cys Asn Glu Ile

45

50

55

55 ctc aac gac acc cgc cct gat gtg ttg agg cag att cac cgc gcc tac 603

Leu Asn Asp Thr Arg Pro Asp Val Leu Arg Gln Ile His Arg Ala Tyr

60

65

70

	ttt gag gcg gga gct gac ttg gtt gag acc aat act ttt ggt tgc aac	651
	Phe Glu Ala Gly Ala Asp Leu Val Glu Thr Asn Thr Phe Gly Cys Asn	
	75 80 85	
5	ctg ccg aac ttg gcg gat tat gac atc gct gat cgt tgc cgt gag ctt	699
	Leu Pro Asn Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Ala Asp Arg Cys Arg Glu Leu	
	90 95 100 105	
10	gcc tac aag ggc act gca gtg gct agg gaa gtg gct gat gag atg ggg	747
	Ala Tyr Lys Gly Thr Ala Val Ala Arg Glu Val Ala Asp Glu Met Gly	
	110 115 120	
15	ccg ggc cga aac ggc atg cgg cgt ttc gtg gtt ggt tcc ctg gga cct	795
	Pro Gly Arg Asn Gly Met Arg Arg Phe Val Val Gly Ser Leu Gly Pro	
	125 130 135	
20	gga acg aag ctt cca tcg ctg ggc cat gca ccg tat gca gat ttg cgt	843
	Gly Thr Lys Leu Pro Ser Leu Gly His Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Arg	
	140 145 150	
25	ggg cac tac aag gaa gca gcg ctt ggc atc atc gac ggt ggt ggc gat	891
	Gly His Tyr Lys Glu Ala Ala Leu Gly Ile Ile Asp Gly Gly Gly Asp	
	155 160 165	
30	gcc ttt ttg att gag act gct cag gac ttg ctt cag gtc aag gct gcg	939
	Ala Phe Leu Ile Glu Thr Ala Gln Asp Leu Leu Gln Val Lys Ala Ala	
	170 175 180 185	
35	gtt cac ggc gtt caa gat gcc atg gct gaa ctt gat aca ttc ttg ccc	987
	Val His Gly Val Gln Asp Ala Met Ala Glu Leu Asp Thr Phe Leu Pro	
	190 195 200	
40	att att tgc cac gtc acc gta gag acc acc ggc acc atg ctc atg ggt	1035
	Ile Ile Cys His Val Thr Val Glu Thr Thr Gly Thr Met Leu Met Gly	
	205 210 215	
45	tct gag atc ggt gcc gcg ttg aca gcg ctg cag cca ctg ggt atc gac	1083
	Ser Glu Ile Gly Ala Ala Leu Thr Ala Leu Gln Pro Leu Gly Ile Asp	
	220 225 230	
50	atg att ggt ctg aac tgc gcc acc ggc cca gat gag atg agc gag cac	1131
	Met Ile Gly Leu Asn Cys Ala Thr Gly Pro Asp Glu Met Ser Glu His	
	235 240 245	
55	ctg cgt tac ctg tcc aag cac gcc gat att cct gtg tcg gtg atg cct	1179
	Leu Arg Tyr Leu Ser Lys His Ala Asp Ile Pro Val Ser Val Met Pro	
	250 255 260 265	
60	aac gca ggt ctt cct gtc ctg ggt aaa aac ggt gca gaa tac cca ctt	1227
	Asn Ala Gly Leu Pro Val Leu Gly Lys Asn Gly Ala Glu Tyr Pro Leu	
	270 275 280	
65	gag gct gag gat ttg gcg cag gcg ctg gct gga ttc gtc tcc gaa tat	1275
	Glu Ala Glu Asp Leu Ala Gln Ala Leu Ala Gly Phe Val Ser Glu Tyr	
	285 290 295	
70	ggc ctg tcc atg gtg ggt ggt tgt tgt ggc acc aca cct gag cac atc	1323
	Gly Leu Ser Met Val Gly Gly Cys Cys Gly Thr Thr Pro Glu His Ile	
	300 305 310	

	cgt gcg gtc cgc gat gcg gtg gtt ggt gtt cca gag cag gaa acc tcc	1371
	Arg Ala Val Arg Asp Ala Val Val Gly Val Pro Glu Gln Glu Thr Ser	
	315 320 325	
5	aca ctg acc aag atc cct gca ggc cct gtt gag cag gcc tcc cgc gag	1419
	Thr Leu Thr Lys Ile Pro Ala Gly Pro Val Glu Gln Ala Ser Arg Glu	
	330 335 340 345	
10	gtg gag aaa gag gac tcc gtc gcg tcg ctg tac acc tcg gtg cca ttg	1467
	Val Glu Lys Glu Asp Ser Val Ala Ser Leu Tyr Thr Ser Val Pro Leu	
	350 355 360	
15	tcc cag gaa acc ggc att tcc atg atc ggt gag cgc acc aac tcc aac	1515
	Ser Gln Glu Thr Gly Ile Ser Met Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ser Asn	
	365 370 375	
20	ggt tcc aag gca ttc cgt gag gca atg ctg tct ggc gat tgg gaa aag	1563
	Gly Ser Lys Ala Phe Arg Glu Ala Met Leu Ser Gly Asp Trp Glu Lys	
	380 385 390	
25	tgt gtg gat att gcc aag cag caa acc cgc gat ggt gca cac atg ctg	1611
	Cys Val Asp Ile Ala Lys Gln Gln Thr Arg Asp Gly Ala His Met Leu	
	395 400 405	
30	gat ctt tgt gtg gat tac gtg gga cga gac ggc acc gcc gat atg gcg	1659
	Asp Leu Cys Val Asp Tyr Val Gly Arg Asp Gly Thr Ala Asp Met Ala	
	410 415 420 425	
35	acc ttg gca gca ctt ctt gct acc agc tcc act ttg cca atc atg att	1707
	Thr Leu Ala Ala Leu Leu Ala Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ile Met Ile	
	430 435 440	
40	gac tcc acc gag cca gag gtt att cgc aca ggc ctt gag cac ttg ggt	1755
	Asp Ser Thr Glu Pro Glu Val Ile Arg Thr Gly Leu Glu His Leu Gly	
	445 450 455	
45	gga cga agc atc gtt aac tcc gtc aac ttt gaa gac ggc gat ggc cct	1803
	Gly Arg Ser Ile Val Asn Ser Val Asn Phe Glu Asp Gly Asp Gly Pro	
	460 465 470	
50	gag tcc cgc tac cag cgc atc atg aaa ctg gta aag cag cac ggt gcg	1851
	Glu Ser Arg Tyr Gln Arg Ile Met Lys Leu Val Lys Gln His Gly Ala	
	475 480 485	
55	gcc gtg gtt gcg ctg acc att gat gag gaa ggc cag gca cgt acc gct	1899
	Ala Val Val Ala Leu Thr Ile Asp Glu Glu Gly Gln Ala Arg Thr Ala	
	490 495 500 505	
60	gag cac aag gtg cgc att gct aaa cga ctg att gac gat atc acc ggc	1947
	Glu His Lys Val Arg Ile Ala Lys Arg Leu Ile Asp Asp Ile Thr Gly	
	510 515 520	
65	agc tac ggc ctg gat atc aaa gac atc gtt gtg gac tgc ctg acc ttc	1995
	Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Lys Asp Ile Val Val Asp Cys Leu Thr Phe	
	525 530 535	
70	ccg atc tct act ggc cag gaa gaa acc agg cga gat ggc att gaa acc	2043
	Pro Ile Ser Thr Gly Gln Glu Glu Thr Arg Arg Asp Gly Ile Glu Thr	
	540 545 550	

	atc gaa gcc atc cgc gag ctg aag aag ctc tac cca gaa atc cac acc	2091
	Ile Glu Ala Ile Arg Glu Leu Lys Lys Leu Tyr Pro Glu Ile His Thr	
	555 560 565	
5	acc ctg ggt ctg tcc aat att tcc ttc ggc ctg aac cct gct gca cgc	2139
	Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile Ser Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg	
	570 575 580 585	
10	cag gtt ctt aac tct gtg ttc ctc aat gag tgc att gag gct ggt ctg	2187
	Gln Val Leu Asn Ser Val Phe Leu Asn Glu Cys Ile Glu Ala Gly Leu	
	590 595 600	
15	gac tct gcg att gcg cac agc tcc aag att ttg ccg atg aac cgc att	2235
	Asp Ser Ala Ile Ala His Ser Ser Lys Ile Leu Pro Met Asn Arg Ile	
	605 610 615	
20	gat gat cgc cag cgc gaa gtg gcg ttg gat atg gtc tat gat cgc cgc	2283
	Asp Asp Arg Gln Arg Glu Val Ala Leu Asp Met Val Tyr Asp Arg Arg	
	620 625 630	
25	acc gag gat tac gat ccg ctg cag gaa ttc atg cag ctg ttt gag ggc	2331
	Thr Glu Asp Tyr Asp Pro Leu Gln Glu Phe Met Gln Leu Phe Glu Gly	
	635 640 645	
30	gtt tct gct gcc gat gcc aag gat gct cgc gct gaa cag ctg gcc gct	2379
	Val Ser Ala Ala Asp Ala Lys Asp Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala	
	650 655 660 665	
35	aat ggc ctt gag gat gat ctg gaa gca ggc atg aag gag aag tct cct	2427
	Asn Gly Leu Glu Asp Asp Leu Glu Ala Gly Met Lys Glu Lys Ser Pro	
	670 675 680	
40	att gcg atc atc aac gag gac ctt ctc aac ggc atg aag acc gtg ggt	2475
	Ile Ala Ile Ile Asn Glu Asp Leu Leu Asn Gly Met Lys Thr Val Gly	
	700 705 710	
45	gag ctg ttt ggt tcc gga cag atg cag ctg cca ttc gtg ctg caa tcg	2523
	Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln Met Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser	
	715 720 725	
50	gca gaa acc atg aaa act gcg gtg gcc tat ttg gaa ccg ttc atg gaa	2571
	Ala Glu Thr Met Lys Thr Ala Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu	
	730 735 740 745	
55	gag gaa gca gaa gct acc gga tct gcg cag gca gag ggc aag ggc aaa	2619
	Glu Glu Ala Glu Ala Thr Gly Ser Ala Gln Ala Glu Gly Lys Gly Lys	
	750 755 760	
60	atc gtc gtg gcc acc gtc aag ggt gac gtg cac gat atc ggc aag aac	2667
	Ile Val Val Ala Thr Val Lys Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn	
	765 770 775	
65	ttg gtg gac atc att ttg tcc aac aac ggt tac gac gtg gtg aac ttg	2715
	Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser Asn Asn Gly Tyr Asp Val Val Asn Leu	
	780 785 790	
70		2763

	ggc atc aag cag cca ctg tcc gcc atg ttg gaa gca gcg gaa gaa cac	2811
	Gly Ile Lys Gln Pro Leu Ser Ala Met Leu Glu Ala Ala Glu Glu His	
	795 800 805	
5	aaa gca gac gtc atc ggc atg tgc gga ctt ctt gtg aag tcc acc gtg	2859
	Lys Ala Asp Val Ile Gly Met Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr Val	
	810 815 820 825	
10	gtg atg aag gaa aac ctt gag gag atg aac aac gcc ggc gca tcc aat	2907
	Val Met Lys Glu Asn Leu Glu Glu Met Asn Asn Ala Gly Ala Ser Asn	
	830 835 840	
15	tac cca gtc att ttg ggt ggc gct gcg ctg acg cgt acc tac gtg gaa	2955
	Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly Ala Ala Leu Thr Arg Thr Tyr Val Glu	
	845 850 855	
20	aac gat ctc aac gag gtg tac acc ggt gag gtg tac tac gcc cgt gat	3003
	Asn Asp Leu Asn Glu Val Tyr Thr Gly Glu Val Tyr Tyr Ala Arg Asp	
	860 865 870	
25	gct ttc gag ggc ctg cgc ctg atg gat gag gtg atg gca gaa aag cgt	3051
	Ala Phe Glu Gly Leu Arg Leu Met Asp Glu Val Met Ala Glu Lys Arg	
	875 880 885	
30	ggt gaa gga ctt gat ccc aac tca cca gaa gct att gag cag gcg aag	3099
	Gly Glu Gly Leu Asp Pro Asn Ser Pro Glu Ala Ile Glu Gln Ala Lys	
	890 895 900 905	
35	aag aag gcg gaa cgt aag gct cgt aat gag cgt tcc cgc aag att gcc	3147
	Lys Lys Ala Glu Arg Lys Ala Arg Asn Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala	
	910 915 920	
40	gcg gag cgt aaa gct aat gcg gct ccc gtg att gtt ccg gag cgt tct	3195
	Ala Glu Arg Lys Ala Asn Ala Ala Pro Val Ile Val Pro Glu Arg Ser	
	925 930 935	
45	gat gtc tcc acc gat act cca acc gcg gca cca ccg ttc tgg gga acc	3243
	Asp Val Ser Thr Asp Thr Pro Thr Ala Ala Pro Pro Phe Trp Gly Thr	
	940 945 950	
50	gcg att gtc aag ggt ctg ccc ttg gcg gag ttc ttg ggc aac ctt gat	3291
	Arg Ile Val Lys Gly Leu Pro Leu Ala Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp	
	955 960 965	
55	gag cgc gcc ttg ttc atg ggg cag tgg ggt ctg aaa tcc acc cgc ggc	3339
	Glu Arg Ala Leu Phe Met Gly Gln Trp Gly Leu Lys Ser Thr Arg Gly	
	970 975 980 985	
60	aac gag ggt cca agc tat gag gat ttg gtg gaa act gaa ggc cga cca	3387
	Asn Glu Gly Pro Ser Tyr Glu Asp Leu Val Glu Thr Glu Gly Arg Pro	
	990 995 1000	
65	cgc ctg cgc tac tgg ctg gat cgc ctg aag tct gag ggc att ttg gac	3435
	Arg Leu Arg Tyr Trp Leu Asp Arg Leu Lys Ser Glu Gly Ile Leu Asp	
	1005 1010 1015	
70	cac gtg gcc ttg gtg tat ggc tac ttc cca gcg gtc gcg gaa ggc gat	3483
	His Val Ala Leu Val Tyr Gly Tyr Phe Pro Ala Val Ala Glu Gly Asp	
	1020 1025 1030	

gac gtg gtg atc ttg gaa tcc ccg gat cca cac gca gcc gaa cgc atg 3531
 Asp Val Val Ile Leu Glu Ser Pro Asp Pro His Ala Ala Glu Arg Met
 1035 1040 1045

5 cgc ttt agc ttc cca cgc cag cag cgc ggc agg ttc ttg tgc atc gcg 3579
 Arg Phe Ser Phe Pro Arg Gln Gln Arg Gly Arg Phe Leu Cys Ile Ala
 1050 1055 1060 1065

10 gat ttc att cgc cca cgc gag caa gct gtc aag gac ggc caa gtg gac 3627
 Asp Phe Ile Arg Pro Arg Glu Gln Ala Val Lys Asp Gly Gln Val Asp
 1070 1075 1080

15 gtc atg cca ttc cag ctg gtc acc atg ggt aat cct att gct gat ttc 3675
 Val Met Pro Phe Gln Leu Val Thr Met Gly Asn Pro Ile Ala Asp Phe
 1085 1090 1095

20 gcc aac gag ttg ttc gca gcc aat gaa tac cgc gag tac ttg gaa gtt 3723
 Ala Asn Glu Leu Phe Ala Ala Asn Glu Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Val
 1100 1105 1110

cac ggc atc ggc gtg cag ctc acc gaa gca ttg gcc gag tac tgg cac 3771
 His Gly Ile Gly Val Gln Leu Thr Glu Ala Leu Ala Glu Tyr Trp His
 1115 1120 1125

25 tcc cga gtg cgc agc gaa ctc aag ctg aac gac ggt gga tct gtc gct 3819
 Ser Arg Val Arg Ser Glu Leu Lys Leu Asn Asp Gly Gly Ser Val Ala
 1130 1135 1140 1145

30 gat ttt gat cca gaa gac aag acc aag ttc ttc gac ctg gat tac cgc 3867
 Asp Phe Asp Pro Glu Asp Lys Thr Lys Phe Phe Asp Leu Asp Tyr Arg
 1150 1155 1160

35 ggc gcc cgc ttc tcc ttt ggt tac ggt tct tgc cct gat ctg gaa gac 3915
 Gly Ala Arg Phe Ser Phe Gly Tyr Gly Ser Cys Pro Asp Leu Glu Asp
 1165 1170 1175

40 cgc gca aag ctg gtg gaa ttg ctc gag cca ggc cgt atc ggc gtg gag 3963
 Arg Ala Lys Leu Val Glu Leu Leu Glu Pro Gly Arg Ile Gly Val Glu
 1180 1185 1190

ttg tcc gag gaa ctc cag ctg cac cca gag cag tcc aca gac gcg ttt 4011
 Leu Ser Glu Glu Leu Gln Leu His Pro Glu Gln Ser Thr Asp Ala Phe
 1195 1200 1205

45 gtg ctc tac cac cca gag gca aag tac ttt aac gtc taacaccttt 4057
 Val Leu Tyr His Pro Glu Ala Lys Tyr Phe Asn Val
 1210 1215 1220

50 gagagggaaa actttccgc acattgcaga tcgtgccact ttaactaagg ttgacggcat 4117
 gattaaggcg attttctggg acatggacgg cacgatgggtg gactctgagc cacagtgggg 4177
 cattgctacc tacgagctca gcgaagccat gggccgcccgc ctcaccccg agctccggga 4237

55 actcaccgtc ggctcgagcc tgccgcgcac catgcgctta tgcgcagagc acgcaggcat 4297
 taca 4301

<210> 2
 <211> 1221
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 5
 <400> 2
 Met Ser Thr Ser Val Thr Ser Pro Ala His Asn Asn Ala His Ser Ser
 1 5 10 15
 10 Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His Val Leu Ile Gly Asp Gly Ala
 20 25 30
 Met Gly Thr Gln Leu Gln Gly Phe Asp Leu Asp Val Glu Lys Asp Phe
 35 40 45
 15 Leu Asp Leu Glu Gly Cys Asn Glu Ile Leu Asn Asp Thr Arg Pro Asp
 50 55 60
 20 Val Leu Arg Gln Ile His Arg Ala Tyr Phe Glu Ala Gly Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Val Glu Thr Asn Thr Phe Gly Cys Asn Leu Pro Asn Leu Ala Asp Tyr
 85 90 95
 25 Asp Ile Ala Asp Arg Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Lys Gly Thr Ala Val
 100 105 110
 Ala Arg Glu Val Ala Asp Glu Met Gly Pro Gly Arg Asn Gly Met Arg
 115 120 125
 30 Arg Phe Val Val Gly Ser Leu Gly Pro Gly Thr Lys Leu Pro Ser Leu
 130 135 140
 35 Gly His Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Arg Gly His Tyr Lys Glu Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Ile Ile Asp Gly Gly Gly Asp Ala Phe Leu Ile Glu Thr Ala
 165 170 175
 40 Gln Asp Leu Leu Gln Val Lys Ala Ala Val His Gly Val Gln Asp Ala
 180 185 190
 Met Ala Glu Leu Asp Thr Phe Leu Pro Ile Ile Cys His Val Thr Val
 195 200 205
 45 Glu Thr Thr Gly Thr Met Leu Met Gly Ser Glu Ile Gly Ala Ala Leu
 210 215 220
 50 Thr Ala Leu Gln Pro Leu Gly Ile Asp Met Ile Gly Leu Asn Cys Ala
 225 230 235 240
 Thr Gly Pro Asp Glu Met Ser Glu His Leu Arg Tyr Leu Ser Lys His
 245 250 255
 55 Ala Asp Ile Pro Val Ser Val Met Pro Asn Ala Gly Leu Pro Val Leu
 260 265 270
 Gly Lys Asn Gly Ala Glu Tyr Pro Leu Glu Ala Glu Asp Leu Ala Gln
 275 280 285

Ala Leu Ala Gly Phe Val Ser Glu Tyr Gly Leu Ser Met Val Gly Gly
 290 295 300
 5 Cys Cys Gly Thr Thr Pro Glu His Ile Arg Ala Val Arg Asp Ala Val
 305 310 315 320
 Val Gly Val Pro Glu Gln Glu Thr Ser Thr Leu Thr Lys Ile Pro Ala
 325 330 335
 10 Gly Pro Val Glu Gln Ala Ser Arg Glu Val Glu Lys Glu Asp Ser Val
 340 345 350
 Ala Ser Leu Tyr Thr Ser Val Pro Leu Ser Gln Glu Thr Gly Ile Ser
 355 360 365
 15 Met Ile Gly Glu Arg Thr Asn Ser Asn Gly Ser Lys Ala Phe Arg Glu
 370 375 380
 20 Ala Met Leu Ser Gly Asp Trp Glu Lys Cys Val Asp Ile Ala Lys Gln
 385 390 395 400
 Gln Thr Arg Asp Gly Ala His Met Leu Asp Leu Cys Val Asp Tyr Val
 405 410 415
 25 Gly Arg Asp Gly Thr Ala Asp Met Ala Thr Leu Ala Ala Leu Leu Ala
 420 425 430
 Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ile Met Ile Asp Ser Thr Glu Pro Glu Val
 435 440 445
 30 Ile Arg Thr Gly Leu Glu His Leu Gly Gly Arg Ser Ile Val Asn Ser
 450 455 460
 35 Val Asn Phe Glu Asp Gly Asp Gly Pro Glu Ser Arg Tyr Gln Arg Ile
 465 470 475 480
 Met Lys Leu Val Lys Gln His Gly Ala Ala Val Val Ala Leu Thr Ile
 485 490 495
 40 Asp Glu Glu Gly Gln Ala Arg Thr Ala Glu His Lys Val Arg Ile Ala
 500 505 510
 Lys Arg Leu Ile Asp Asp Ile Thr Gly Ser Tyr Gly Leu Asp Ile Lys
 515 520 525
 45 Asp Ile Val Val Asp Cys Leu Thr Phe Pro Ile Ser Thr Gly Gln Glu
 530 535 540
 50 Glu Thr Arg Arg Asp Gly Ile Glu Thr Ile Glu Ala Ile Arg Glu Leu
 545 550 555 560
 Lys Lys Leu Tyr Pro Glu Ile His Thr Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile
 565 570 575
 55 Ser Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg Gln Val Leu Asn Ser Val Phe
 580 585 590
 Leu Asn Glu Cys Ile Glu Ala Gly Leu Asp Ser Ala Ile Ala His Ser
 595 600 605

Ser Lys Ile Leu Pro Met Asn Arg Ile Asp Asp Arg Gln Arg Glu Val
 610 615 620
 5 Ala Leu Asp Met Val Tyr Asp Arg Arg Thr Glu Asp Tyr Asp Pro Leu
 625 630 635 640
 Gln Glu Phe Met Gln Leu Phe Glu Gly Val Ser Ala Ala Asp Ala Lys
 645 650 655
 10 Asp Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala Met Pro Leu Phe Glu Arg Leu
 660 665 670
 Ala Gln Arg Ile Ile Asp Gly Asp Lys Asn Gly Leu Glu Asp Asp Leu
 675 680 685
 15 Glu Ala Gly Met Lys Glu Lys Ser Pro Ile Ala Ile Ile Asn Glu Asp
 690 695 700
 20 Leu Leu Asn Gly Met Lys Thr Val Gly Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln
 705 710 715 720
 Met Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser Ala Glu Thr Met Lys Thr Ala
 725 730 735
 25 Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu Glu Glu Ala Glu Ala Thr Gly
 740 745 750
 Ser Ala Gln Ala Glu Gly Lys Gly Lys Ile Val Val Ala Thr Val Lys
 755 760 765
 30 Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser
 770 775 780
 35 Asn Asn Gly Tyr Asp Val Val Asn Leu Gly Ile Lys Gln Pro Leu Ser
 785 790 795 800
 Ala Met Leu Glu Ala Ala Glu Glu His Lys Ala Asp Val Ile Gly Met
 805 810 815
 40 Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr Val Val Met Lys Glu Asn Leu Glu
 820 825 830
 Glu Met Asn Asn Ala Gly Ala Ser Asn Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly
 835 840 845
 45 Ala Ala Leu Thr Arg Thr Tyr Val Glu Asn Asp Leu Asn Glu Val Tyr
 850 855 860
 50 Thr Gly Glu Val Tyr Tyr Ala Arg Asp Ala Phe Glu Gly Leu Arg Leu
 865 870 875 880
 Met Asp Glu Val Met Ala Glu Lys Arg Gly Glu Gly Leu Asp Pro Asn
 885 890 895
 55 Ser Pro Glu Ala Ile Glu Gln Ala Lys Lys Lys Ala Glu Arg Lys Ala
 900 905 910
 Arg Asn Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala Ala Glu Arg Lys Ala Asn Ala
 915 920 925

Ala Pro Val Ile Val Pro Glu Arg Ser Asp Val Ser Thr Asp Thr Pro
 930 935 940
 5 Thr Ala Ala Pro Pro Phe Trp Gly Thr Arg Ile Val Lys Gly Leu Pro
 945 950 955 960
 Leu Ala Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp Glu Arg Ala Leu Phe Met Gly
 965 970 975
 10 Gln Trp Gly Leu Lys Ser Thr Arg Gly Asn Glu Gly Pro Ser Tyr Glu
 980 985 990
 Asp Leu Val Glu Thr Glu Gly Arg Pro Arg Leu Arg Tyr Trp Leu Asp
 995 1000 1005
 15 Arg Leu Lys Ser Glu Gly Ile Leu Asp His Val Ala Leu Val Tyr Gly
 1010 1015 1020
 Tyr Phe Pro Ala Val Ala Glu Gly Asp Asp Val Val Ile Leu Glu Ser
 025 1030 1035 1040
 Pro Asp Pro His Ala Ala Glu Arg Met Arg Phe Ser Phe Pro Arg Gln
 1045 1050 1055
 25 Gln Arg Gly Arg Phe Leu Cys Ile Ala Asp Phe Ile Arg Pro Arg Glu
 1060 1065 1070
 Gln Ala Val Lys Asp Gly Gln Val Asp Val Met Pro Phe Gln Leu Val
 1075 1080 1085
 30 Thr Met Gly Asn Pro Ile Ala Asp Phe Ala Asn Glu Leu Phe Ala Ala
 1090 1095 1100
 Asn Glu Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Val His Gly Ile Gly Val Gln Leu
 105 1110 1115 1120
 Thr Glu Ala Leu Ala Glu Tyr Trp His Ser Arg Val Arg Ser Glu Leu
 1125 1130 1135
 40 Lys Leu Asn Asp Gly Gly Ser Val Ala Asp Phe Asp Pro Glu Asp Lys
 1140 1145 1150
 Thr Lys Phe Phe Asp Leu Asp Tyr Arg Gly Ala Arg Phe Ser Phe Gly
 1155 1160 1165
 45 Tyr Gly Ser Cys Pro Asp Leu Glu Asp Arg Ala Lys Leu Val Glu Leu
 1170 1175 1180
 Leu Glu Pro Gly Arg Ile Gly Val Glu Leu Ser Glu Glu Leu Gln Leu
 185 1190 1195 1200
 His Pro Glu Gln Ser Thr Asp Ala Phe Val Leu Tyr His Pro Glu Ala
 1205 1210 1215
 55 Lys Tyr Phe Asn Val
 1220

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
 - 20 3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
 - 25 5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
7. Coryneforme Bakterien, in denen das methH-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
8. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das methH-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
 - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des

Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
5 einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem
10 Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das methH-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression
15 des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das methH-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen
20 Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid methH kodiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
25 von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
 - 15.1 das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
 - 30 15.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,

- 15.3 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk,
- 15.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 5 15.5 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi
- 15.6 das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA
- 10 15.7 das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB
- 15.8 das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD
- 15.9 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA
- 15 15.10 das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende Gen metY

verstärkt bzw. überexprimiert.

- 20 16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 25 16.1 das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB
- 16.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA

- 16.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC
- 16.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh
- 5 16.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck
- 16.6 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase kodierende Gen pgi
- 10 16.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- abschwächt.
17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
- 15
18. Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte
- 20 a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- 25 c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- d) Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-

Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet
5 dass daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man
zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges von L-
Methionin verstärkt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
10 teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung L-
Methionin verringern.
21. Verfahren gemäß Anspruch 19, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression
der Polynukleotide, die für das methH-Gen kodieren
15 verstärkt, insbesondere überexprimiert.
22. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
t, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium
glutamicum einsetzt.
- 20 23. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet
dass man zusätzlich noch einen oder mehrere folgender
Schritte durchführt:
- e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen
25 Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-
Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-
Methionin, zu dem gemäß b), c) und/oder d)
erhaltenen Produkten;
- f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach b) bis e)
30 erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und
Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der
Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot
und Kleie; oder

g) Überführung der nach b) bis f) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

- 5 24. Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 23, dadurch gekennzeichnet dass ein Teil der Biomasse entfernt wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet dass bis zu 100% der Biomasse entfernt wird.
- 10 26. Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 23, dadurch gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei bis zu 5 Gew.-% liegt.
27. Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei weniger als 2 Gew.-% liegt.
- 15 28. Verfahren gemäß Anspruch 23, 24, 25, 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet dass die Filmbildner Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginat, Stearate, Stärken, Gummis oder Celluloseether sind.
- 20 29. Tierfuttermittel-Additiv hergestellt gemäß Ansprüchen 18 bis 28.
- 30 30. Tierfuttelmittel-Additiv gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass es 1 Gew.-% bis 80 Gew.-% L_Methionin, D-Methionin, D,L-Methionin oder einer Mischung davon, bezogen auf die Trockenmasse des
- 25 Tierfuttermittel-Additivs, enthält.
- 30 31. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für Homocystein-Methyltransferase II kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des Homocystein-Methyltransferase II Gens aufweisen, dadurch

gekennzeichnet, dass man die Polynukleotidsequenzen
gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4 als
Hybridisierungssonden einsetzt.

Neue für das methH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid,
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der
5 Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit
einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine
Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No.
2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in
20 denen zumindest das methH-Gen verstärkt vorliegt, und die
Verwendung der Polynukleotidsequenzen als
Hybridisierungssonden.